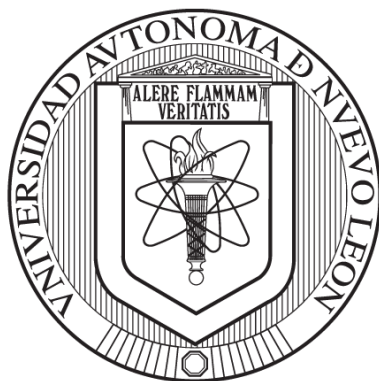


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO EN CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA



**CARACTERIZACIÓN Y VARIACIÓN DE LA MICROBIOTA UTERINA EN
GANADO CÁRNICO Y EFECTO EN PARÁMETROS REPRODUCTIVOS.**

POR

EMILIANO ZAPATA LUNA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

DICIEMBRE 2020

**CARACTERIZACIÓN Y VARIACIÓN DE LA MICROBIOTA UTERINA EN
GANADO CÁRNICO Y EFECTO EN PARÁMETROS REPRODUCTIVOS**

Comité de Tesis

Dr. J. Rubén Cervantes Vega
Director de Tesis

M.C. Aimé Jazmín Garza Arredondo
Co-Directora

Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Co-Director

M.C. Nelson Manzanares Miranda
Co-Director

M.C. David Domínguez Díaz
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco con mucho fervor a todas las personas e instituciones que aportaron su apoyo a mí personalmente y a la realización del proyecto.

A el Dr. J. Rubén Cervantes Vega que apoyó y facilitó realizar el proyecto, así como a todos los profesores que me ayudaron en desarrollar el experimento para lograr aportar información de las complejas interacciones que influyen en la fertilidad.

A el Centro de Investigación de Producción Agropecuaria y a el director M.C. Nelson Manzanares Miranda por permitirme realizar el experimento en animales e instalaciones del CIPA. De igual manera a los trabajadores por su tiempo y esfuerzo invertido colaborando con la realización del proyecto.

Al Conacyt por otorgar la beca de manutención, así como posibilitar efectuar una estancia de investigación en el extranjero.

A los Drs. Jaswang Singh y Dinesh Dadarwall por abrirme las puertas y recibirme en la Universidad de Saskatchewan y compartirme su conocimiento en el ámbito científico.

A mis compañeros y amigos del posgrado con los que pasamos buenos ratos dentro y fuera de la universidad.

A mis padres, los cuales siempre me dan su apoyo incondicional y me ayudan a crecer académica y personalmente.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, que me apoyaron incondicionalmente en mi proyecto y en mis decisiones.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
ÍNDICE.....	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	2
ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL ÚTERO.....	3
CAMBIOS INMUNOLÓGICOS.....	6
PUERPERIO	6
INVOLUCIÓN UTERINA	6
REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA	7
CITOLOGÍA UTERINA POST PARTO	8
ENDOMETRITIS.....	9
DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA	11
PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS.....	12
ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	14
MICROBIOTA EN LA IMPLANTACIÓN	16
SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN	17
PROTOCOLO DE ESTRÓGENOS-PROGESTÁGENOS EN GANADO DE CARNE.....	18
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS DEL TRABAJO	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	20

ÁREA Y TIEMPO DE MUESTREO.....	20
MANEJO ANIMAL	21
PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN	21
MUESTRA CITOLOGÍA.....	22
MUESTRA MICROBIOLÓGICA.....	23
EXTRACCIÓN DE ADN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S.....	24
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
RESULTADOS.....	25
CITOLOGÍA ENDOMETRIAL	25
PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA	26
CARACTERIZACIÓN GENOMICA DE LA MICROBIOTA UTERINA.....	26
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de muestras apareadas para los filums con mayor cambio entre las tomas de muestra citológica durante un protocolo de sincronización de estros usando progestágenos	28
Tabla 2. Sumario de las Hipótesis para pruebas no paramétricas	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del corte histológico del útero de un bovino.	4
Figura 2. Representación de las fases del ciclo estral de la vaca.	5
Figura 3. Frotis de una citología uterina en la vaca.	8
Figura 4. Frotis de una citología uterina en la vaca mostrando oros hallazgos.	9
Figura 5. Células endometriales en presencia de dos bacterias potencialmente patógenas.	10
Figura 6. Reducción de piruvato a L-Lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa.	14
Figura 7. Representación de la Activación de la vía de señalización TLR/MyD88.	15
Figura 8. Protocolo de sincronización a base de progestágenos y estrógenos de 8 días.	21
Figura 9. Pistola de inseminación artificial adaptada para muestra citológica vaginal en vacas.	22
Figura 10. Tiempos en los que se realizaron los raspados uterinos para la secuenciación.	23
Figura 11. Distribución del conteo de polimorfonucleares en los animales muestreados.	26
Figura 12. Abundancia relativa en el día 0 del protocolo de inseminación.	27
Figura 13. Abundancia relativa en el día 8 del protocolo de inseminación.	28
Figura 14. Comparación de abundancia relativa del día 8 de las vacas vacías y preñadas.	29

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
BE	Benzoato de Estradiol
CDCs	Citolisinas dependientes de colesterol
CIDR	Dispositivo intravaginal que contiene progesterona
CO₂	Dióxido de carbono
dNK	Células natural killer deciduales
DE	Desviación Estandar
dpp	Días post parto
E₂	Estrógeno
eCG	Hormona Coriónica Equina
eNK	Células natural killer endometriales
EnPEC	<i>E. coli</i> patógena endometrial
ERK1	Proteína quinasa activada por mitógeno 3
FSH	Hormona Foliculo Estimulante
g	Gramos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos
GnRH	Factor liberador de Gonadotropinas
H⁺	Hidrogeno
hCG	Gonadotropina coriónica humana
IA	Inseminación artificial
IATF	Inseminación artificial a tiempo fijo
IFN_γ	Interferón gamma

IGFBP	Proteína de unión a IGF
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IRAK	Quinasa asociada al receptor de interleucina-1
JNK	Proteína quinasa activada por estrés
LAP	Péptidos antimicrobianos linguales
LGALS9	Gen glectina-9
LH	Hormona Luteinizante
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LPS	Lipopolisacárido
mg	miligramos
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad I
Mφ	Macrófago
MUC	Mucina
MyD88	Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NF-κB	Factor Nuclear κB
NK	Natural killer
OTU	Unidad taxonómica operativa
P₄	Progesterona
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PF2α	Prostaglandina F2α
PLO	Pilosina O
PMN	Polimorfonucleares

PTGS2	Prostaglandina G / H sintasa
TAB	Proteínas de unión a TAK
TAK	Factor de crecimiento transformante β -quinasa activada
TAP	Péptido antimicrobianos traqueales
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF6	Factor 6 asociado al TNFR
UBC13	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 13
UEV1A	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 variante 1A
UI	Unidades Internacionales

}

RESUMEN

Utilizando secuenciación genómica de nueva generación, se determinó las poblaciones bacterianas que existen en el útero de vacas adultas dentro de un protocolo de sincronización de estrógenos-progestágenos de 8 días fueron determinadas. En donde se tomaron muestras en el día 0 y día 8, se realizó inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) el día 10. Las muestras fueron secuenciadas en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por un sistema Illumina Myseq. Previamente se llevó a cabo una citología uterina con la técnica de citocepillo en el día 0 y se hizo un barrido en una laminilla, que posteriormente se fijó y tiñó para diagnosticar endometritis subclínica. Se determinó la gestación mediante ultrasonido el día 30 post IATF. Los parámetros analizados y comparados con las poblaciones presentes en el útero son: días abiertos, raza, condición corporal, porcentaje de polimorfonucleares, diagnóstico de endometritis subclínica, actividad ovárica y gestación a primer servicio. Esta investigación pretende aportar información necesaria para poder determinar si existe una relación entre la microbiota uterina y la gestación, esto con el fin de contribuir a generar protocolos para mantener la microbiota uterina equilibrada y mejorar el porcentaje de preñez.

La prevalencia aparente de endometritis subclínica en ganado de carne ($n=32$) es de 6.25% y prevalencia real de 2.27% con un nivel de confianza de 95%, con una sensibilidad de 60% y una especificidad del 95%. Se obtuvo un 40% de preñez (14/35). Se secuenciaron 33 filums diferentes, con una abundancia relativa de 34% Firmicutes, 30% Proteobacteria, 18% Bacteroidetes, 9% Actinobacteria... para las muestras obtenidas en el día cero. La abundancia relativa de muestras del día 8 fue 28% Firmicutes, 28% Proteobacteria, 14% Bacteroidetes, 14% Fusobacteria... Se encontró diferencia significativa ($p<0.05$) para el incremento de *Fusobacterium* entre el día 0 y día 8 de muestreo de vacas carnicas dentro de un protocolo de sincronización e inseminación a tiempo fijo. Las vacas que se preñaron tuvieron menos OTU el día 8 que el día 0 para las bacterias del filum Fusobacteria.

ABSTRACT

Using next generation genomic sequencing (NGS), the bacterial populations that exist in the uterus of adult cows within an 8-day estrogen-progestogen synchronization protocol were determined. Where samples were taken on day 0 and day 8, fixed time artificial insemination (IATF) was performed on day 10. The samples were sequenced in Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., by an Illumina MySeq Sequencing System. Previously uterine cytology was performed with the cytobrush technique on day 0 and a sweep was performed on a slide, which was subsequently fixed and dyed to diagnose subclinical endometritis. Pregnancy was determined by ultrasound on day 30 post IATF. The variables analyzed and compared with the bacterial populations present in the uterus are days open, breed, body condition, percentage of polymorphonuclears, diagnosis of subclinical endometritis, ovarian activity and pregnancy at first service. This research aims to provide the necessary information to determine whether there is a relationship between the uterine microbiota and pregnancy, this in order to help design protocols to keep the uterine microbiota balanced and improve the percentage of pregnancy in cows.

Results: The apparent prevalence of subclinical endometritis in cattle (n=32) is 6.25% and actual prevalence of 2.27% with a confidence level of 95%, with a sensitivity of 60% and a specificity of 95%. A 40% pregnancy (14/35) was obtained. 33 different bacterial filums were sequenced, with a relative abundance of 34% Firmicutes, 30% Proteobacteria, 18% Bacteroidetes, 9%, Actinobacteria samples obtained on day zero. The relative abundance of samples of day 8 was 28% Firmicutes, 28% Proteobacteria, 14% Bacteroidetes, 14% Fusobacteria. A significant difference was found ($p < 0.05$) for the increase in *Fusobacterium* filum between day 0 and day 8 of sampling of cows within a protocol of synchronization and ITAF. Pregnancies after the IATF program had less OTU on day 8 than day 0 for *Fusobacteria* bacterial filum.

INTRODUCCIÓN

En la ganadería una de las metas es lograr que las vacas produzcan una cría al año, tomando en cuenta que la gestación dura en promedio 285 días y un año tiene 365 días, solo se tiene 80 días después del parto como período para que la vaca pueda quedar preñada nuevamente y así se cumpla el tener una cría al año, sin embargo, por condiciones multifactoriales, en muchos casos, no se logra la meta.

En el ganado bovino una disbiosis uterina (alteración de la microbiota del útero) puede causar patologías que repercuten en la fertilidad. (Sheldon et al., 2017; Bogado et al., 2017; Barajas et al., 2018). En el origen de la inflamación se origina el nombre de las enfermedades uterinas; metritis es la inflamación de la pared uterina, usualmente presentada entre el día 20 postparto, ésta puede presentar fiebre hasta signos de toxemia (Sheldon, 1999; Haimlerl et al., 2017), la endometritis es la inflamación del endometrio, se caracteriza por secreciones vaginales mucopurulentas usualmente presentada después de los 21 días posparto. En esta enfermedad, la vaca afectada puede no presentar signos y si este es el caso, es llamada endometritis subclínica. Bicalho et al. (2017 a) encontraron un incremento de *Fusobacterias* y *Bacterioidetes* en vacas con metritis comparada con sanas. Y han encontrado *E. coli* y *Trueperella* presente en vacas con endometritis. (Wang et al., 2018; Sheldon et al., 2006; Carneiro et al., 2016; Brodzki et al., 2014). El tratamiento más común para estas enfermedades es la administración intrauterina de antibióticos para combatir la infección, sin embargo, esto barre con la microbiota comensal del órgano lo cual podría alterar la efectividad reproductiva.

La utilización de la tecnología de secuenciación de nueva generación para la determinación de las poblaciones bacterianas presentes en el útero de las vacas que estarán sometidas a manejos zootécnicos que permitan una gestación, podría ser de utilidad para identificar las condiciones en las cuales la ausencia, la disminución o el aumento de determinadas poblaciones bacterianas contribuye o repercute negativamente en la gestación.

ANTECEDENTES

En los años 30s y 40s del siglo pasado, Fitch y Bishop (1932) así como Clark y Stevenson (1949) fueron pioneros realizando experimentos para determinar poblaciones bacterianas en el útero de bovinos y probablemente por las pobres técnicas de aislamiento bacteriano y su identificación, llegan a la conclusión que el útero está libre de bacterias; sin embargo, Conklin (1931) y Williams (1943) lograron aislar ciertos microorganismos en úteros con problemas clínicos; por lo que, la presencia de bacterias, se asoció con un problema patológico.

A lo largo del tiempo se siguieron realizando investigaciones acerca de la microbiota uterina en diferentes especies, Dawson en 1959 hace una recopilación sobre algunos estudios bacteriológicos de úteros normales de vacunos, en donde concluye que de un 20-40% de los úteros examinados contienen bacterias; *micrococcus* fue el microorganismo más común encontrado, aproximadamente en el 60% de las recolecciones, siendo *Streptococcus* el segundo o tercer género más frecuente. En conejos las bacterias aisladas predominantes fueron *Staphylococcus* coagulasa negativa, seguido por *micrococcus sp.* (Jacques et al., 1986).

Las nuevas técnicas de identificación de bacterias, como el secuenciador de nueva generación, ha permitido reemplazar la caracterización de patógenos por su morfología, propiedades de tinción o su criterio metabólico y ahora identificarlas por su secuencia de ácido desoxiribonucleico, permitiendo ser más precisos. (Behjati & Tarpey, 2013). El filum más encontrado utilizando esta técnica, en úteros de mujeres sanas, fue el *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (Baker et al., 2018; Franasiak et al., 2016; Moreno et al., 2016). De igual manera en bovinos los filums encontrados son *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Fusobacterium* siendo estos dos últimos potencialmente patógenos. (Bicalho et al., 2017b; Moore et al. 2017; Jeon et al., 2015).

ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL ÚTERO

El útero es un órgano muscular que se desarrolla a partir de los conductos de Müller, este en la vaca, consta de dos cuernos, un cuerpo y un cuello o cérvix, en los rumiantes, existen entre 70-120 estructuras llamadas carúnculas distribuidas en el endometrio, las cuales en animales preñados se unen a los cotiledones de la placenta y forman el placentoma.

El útero realiza diferentes funciones reproductivas como proveer el ambiente adecuado para el desarrollo del embrión y ofrecer nutrientes para su desarrollo, así mismo gracias a los fluidos uterinos los espermatozoides adquieren la facultad de fecundar al ovocito, proceso conocido como capacitación. (Galina, 2008; Hafez, 1996; Youngquist, 2007).

El corte histológico del útero está conformado por el perimetrio, miometrio y endometrio (Figura 1). El perimetrio está localizado en la parte externa del útero, esta es una membrana serosa y una delgada capa de tejido conectivo. El miometrio está formado por fibras de músculo liso, acomodado de manera circular y gruesa en la capa interna, y en la capa externa de manera longitudinal y menos gruesa, estas dos capas están separadas por una capa vascular. El endometrio es la mucosa interna que varía constantemente por los cambios en los niveles de hormonas durante el ciclo estral. (Arai et al., 2013; Lee et al., 2011). El epitelio es cilíndrico simple o cúbico simple con algunas porciones ciliadas, debajo del epitelio luminal está el estroma que está formado por tejido conectivo y glándulas uterinas que son tubulares, simples y ramificadas, se encargan de producir la secreción histotrófica y están distribuidas a lo largo de todo el endometrio excepto en las carúnculas; después está el estrato compacto que es una zona organizada por fibroblastos y se va perdiendo la organización mientras más profundo, y se le llama estrato esponjoso en el cual se encuentran vasos sanguíneos y células del sistema inmune.

El sistema inmune es amplio y cambiante, las células natural killer endometriales (eNK) se encuentran en un endometrio sin gestación; siendo las $CD56^{\text{bright}} CD16^{\text{dim}}$ NK las más abundantes, y una pequeña población de $CD56^+ CD16^+$ NK que son especializadas en destruir células infectadas. (Dosiou & Giudice, 2005). Los macrófagos y células dendríticas constituyen 10-20% de los leucocitos uterinos. (Mori et al., 2016).

Las células T, representan la tercera fracción más abundante de células inmunes en el endometrio (Benner et al., 2018), y las células menos abundantes son los neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, linfocitos (Figura 1). (Espejel & Medrano, 2017). Durante la interfase materno-fetal en la preñez, las células natural killer deciduales (dNK) son la población más grande de leucocitos, estas tienen una baja citotoxicidad y residen en la placenta. (Benner et al., 2018)

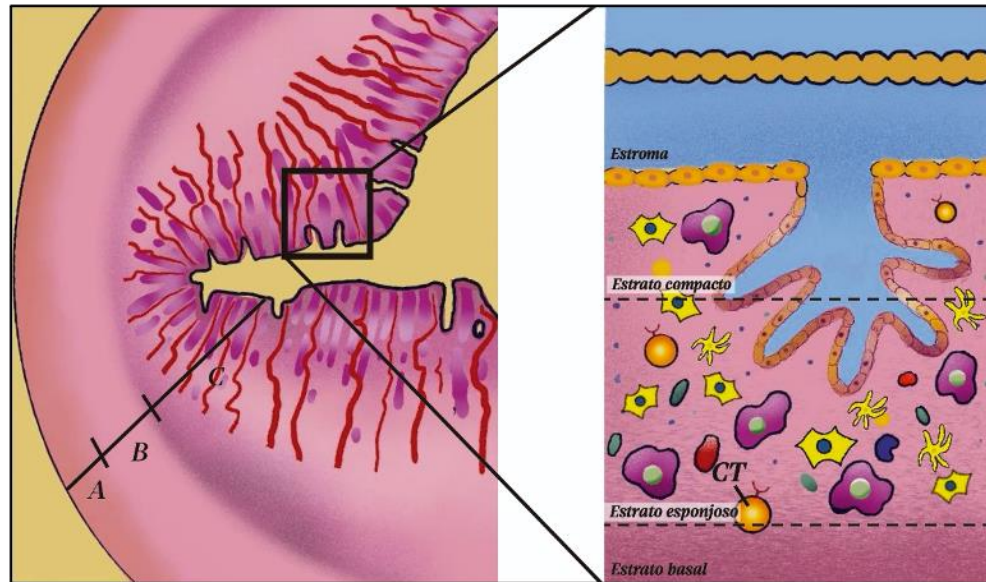


Figura 1. Representación del corte histológico del útero de un bovino.

A) Perimetrio B) Miometrio C) Endometrio. Se simula una ampliación en la zona del endometrio donde se encuentran diferentes células. eNK=Natural killer endometriales, Neo=Neutrófilo, MΦ=Macrófagos, CT=Células T, FB=Fibroblastos.

Las características del endometrio varían en función con la fase del ciclo estral, estas variaciones dependen en su mayoría del nivel de las hormonas esteroideas, estrógenos y progesterona. Los estrógenos provocan la proliferación de la mucosa durante la fase folicular o proliferativa, así como la síntesis de receptores para progesterona de esta manera los estrógenos preparan el útero para la fase secretora o luteal que es dominada por la progesterona. Estas modificaciones uterinas crean un ambiente favorable para la implantación del embrión y una preñez exitosa. (Espejel & Medrano 2017; Lee et al., 2011; Spencer T. & Hansen T. 2015).

El endometrio en su fase proliferativa es caracterizado por el incremento progresivo de su grosor, incrementando el número de células, al inicio de esta fase el endometrio es delgado, el estroma se pierde y las glándulas cilíndricas simples son escasas y el lumen es estrecho. Con la acción de los estrógenos la vascularización aumenta, las células luminales y glandulares realizan mitosis y se presenta edema. Al final de esta etapa el estroma se vuelve denso, las glándulas son grandes en número, largas y sinuosas, el epitelio luce pseudoestratificado y el lumen está vacío. La fase secretora o luteal es el periodo dominado por el cuerpo lúteo funcional que secreta progesterona, el endometrio alcanza su pico máximo de grosor, los vasos sanguíneos se alargan notablemente, las glándulas son más abundantes, tortuosas y acortadas, en esta fase desarrollan su capacidad secretora. El epitelio glandular es simple cilíndrico; sin embargo, en algunas partes es cilíndrico estratificado, y contiene una gran cantidad de vacuolas secretoras. (Espejel & Medrano 2017). (Figura 2).

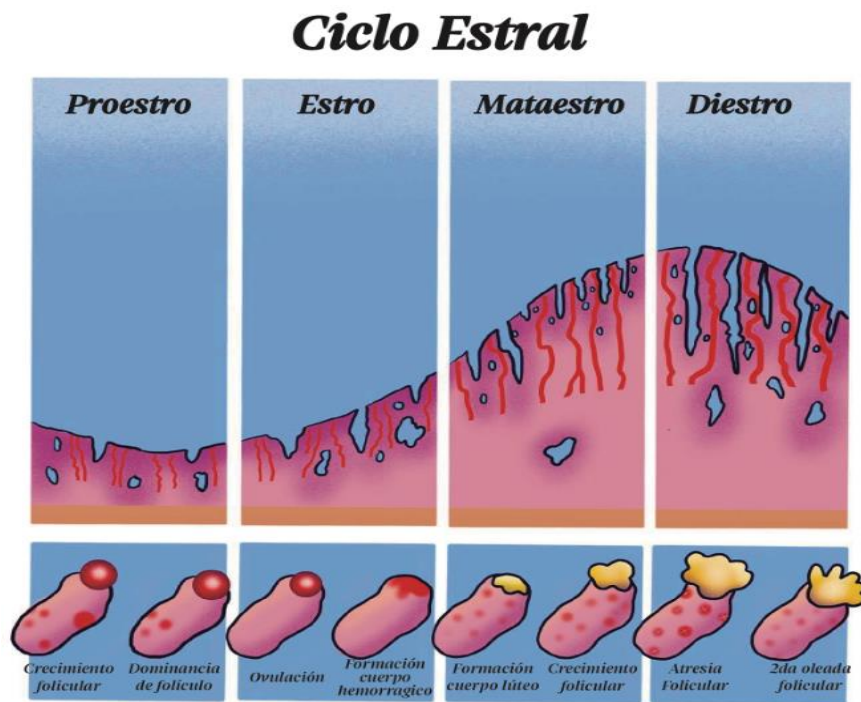


Figura 2. Representación de las fases del ciclo estral de la vaca.

En la parte central se muestra como varía el endometrio dentro del ciclo, y en la parte inferior, las diferentes estructuras de un ovario en las etapas del ciclo

CAMBIOS INMUNOLÓGICOS

Durante la preñez temprana el trofoblasto detiene la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I lo cual le permite un desarrollo de la placenta normal y sobrevivencia del feto, esto es esencial para que no exista un rechazo de parte de la madre. En la placenta madura, el reconocimiento materno del MHC I desencadena una respuesta inflamatoria que contribuye a la expulsión del alantocorion en el parto.

La expulsión del feto desencadena un proceso inflamatorio en el útero en el cual se incrementa la producción de factores activadores de neutrófilos, así como interleucinas. (Hopper, 2015).

PUERPERIO

El parto se completa después de la expulsión de las membranas fetales dentro de las primeras 12 horas seguidas del nacimiento, una retención ocurre cuando las membranas no han sido expulsadas dentro de 24 horas. El periodo inmediato al parto se conoce como puerperio, se puede dividir en puerperio temprano, puerperio clínico y todo el puerperio; el puerperio temprano dura alrededor de 9 días; el puerperio clínico dura alrededor de 21 días en donde el útero y los cuernos uterinos regresan a su tamaño normal pero no su histología estructural normal; todo el puerperio dura al menos 42 días durante el cual el útero recobra su estructura histológica normal. (Elmetwally, 2018).

INVOLUCIÓN UTERINA

El útero después del parto debe volver a su tamaño y funciones de no gestante por lo que ocurre un proceso de involución en donde los cuernos y útero reducen su tamaño. Este proceso es necesario para que la vaca vuelva a concebir. Una vez el feto es expulsado, la oxitocina y prostaglandina F2 α siguen actuando en el útero realizando contracciones las cuales provocan la reducción del tamaño de este. El aparato reproductor puede pesar 10 kg aproximadamente en la primera semana por lo que puede ser encontrado fácilmente en la porción craneal de la cavidad pelviana durante la primera semana. Los cuernos se acortan, pero permaneces engrosados durante la segunda semana. Después del día 25 pp

el útero puede ser retraído a la cavidad pelviana por manipulación rectal. La involución uterina es considerada completa cuando los cuernos han regresado a su tamaño, o casi su tamaño similar no gestante y se encuentra en la cavidad pélvica con un tono y consistencia normal. (Hopper, 2015).

REINICIO DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA

Durante la preñez las ondas foliculares siguen su ciclo normal con la excepción de que los folículos dominantes no llegan a la ovulación, sin embargo, durante los últimos 21 días de gestación, no se encuentran folículos de 6 mm o mayores (Adams & Singh, 2015), esto debido a que en las últimas semanas la placenta bovina aumenta la síntesis de estradiol lo que provoca una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, inhibiendo así la síntesis del Factor liberador de Gonadotropinas (GnRH) y consecuentemente las hormonas hipofisiarias reprimiendo el crecimiento folicular. (Henao, 2001). El estro y la ovulación suelen suspenderse por la lactancia (anestro lactacional), además la supresión del crecimiento folicular puede alargarse debido a una mala nutrición, mala condición corporal, la producción de leche o desórdenes patológicos. (Adams & Singh, 2015).

El reinicio de la actividad ovárica es esencial para una fertilidad normal y un aceptable intervalo entre partos. Hacia el día 50 post parto, alrededor del 95% de las vacas lecheras inician sus ciclos ováricos, pero solo un 40% en el ganado de carne lograra reiniciarlo estos días. (Hafez, 1996). El intervalo entre el parto y la primera ovulación en ganado lechero es en promedio 21 días, siendo un rango de 10-55 días, mientras que en el ganado de carne el promedio está en 30.6 días. (Adams & Singh, 2015).

La recuperación del ciclo estral depende de la interacción entre el hipotálamo e hipófisis que ocurre en tres fases. Durante las primeras 2-4 semanas, después del parto, se caracteriza por el escaso almacenamiento de LH en la hipófisis anterior, el hipotálamo empieza a liberar GnRH a el sistema porta-hipofisaria, un pulso cada 4 u 8 horas, lo que permite un incremento de FSH provocando el reclutamiento temprano de folículos. La segunda fase está relacionada con el incremento de la sensibilidad del hipotálamo sobre el estradiol, creando una retroalimentación positiva, aumentando la frecuencia de

liberación de pulsos de GnRH y así se va acumulando progresivamente la LH en la hipófisis anterior. Por último, en la tercera fase, es necesario despojar el amamantamiento ya que esto genera una retroalimentación negativa para el crecimiento folicular. (Henao, 2001; Elmetwally, 2018)

CITOLOGÍA UTERINA POST PARTO

Esta metodología nos permite recolectar células que se encuentran en el tracto reproductor femenino. La citología uterina consiste en realizar un raspado con un cepillo cervical las paredes endometriales, esto logrado, con una pistola de IA adaptada en la cual se pueda enroscar el cepillo citológico. (Madoz et al., 2013; Vallejo et al., 2014). Con el raspado listo, se procede a realizar un frotis en una laminilla, para posteriormente realizar una tinción con Diff Quick, una variante de la tinción de Romanowsky. (DeMay 2011).

El frotis visto desde el microscopio se observan diferentes tipos de células las cuales son clasificadas como células anucleadas, superficiales, intermedias, parabasales y basales. (Vallejo, et al., 2014). (Figura 3). Así mismo pueden ser encontradas células ciliadas, secretoras, eritrocitos, eosinófilos, neutrófilos o células espermáticas, en menor medida o en casos particulares. (**Figura 4**).

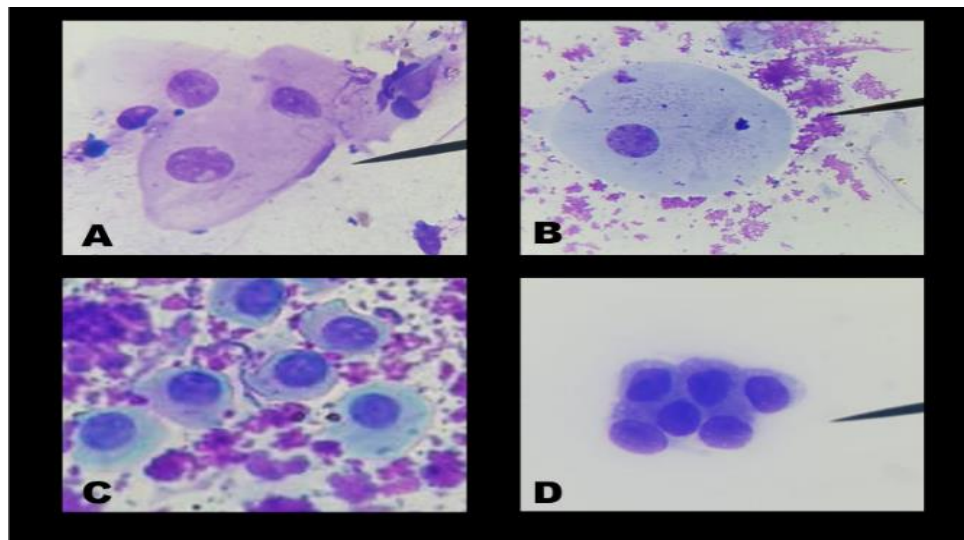


Figura 3. Frotis de una citología uterina en la vaca. A) Células superficiales B) Intermedias C) Parabasales D) Basales

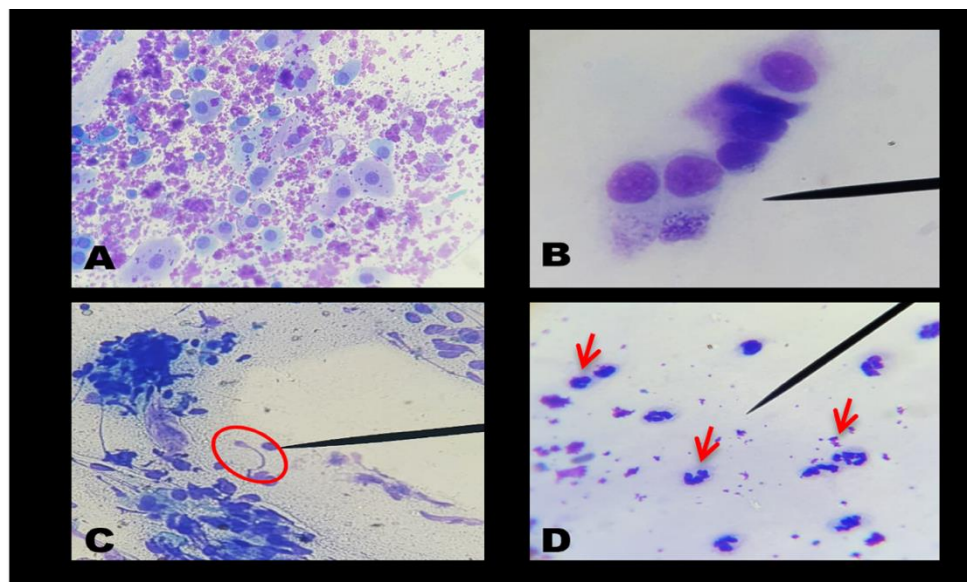


Figura 4. Frotis de una citología uterina en la vaca mostrando oros hallazgos.

A) Moco cervical (Mucinas) B) Células Secretoras C) Espermatozoide D) Neutrófilos

ENDOMETRITIS

La endometritis subclínica se define como la inflamación del endometrio sin signos externos de enfermedad, la cual influye negativamente en las tasas de gestación. La información de la prevalencia de ganado lechero es amplia, sin embargo, la de ganado de carne es muy pobre, un estudio realizado por Barajas et al., (2018) demostró una prevalencia del 43% en bovinos de leche en el centro de México con endometritis subclínica, el cual disminuyó la tasa de gestación en un 11.4% en el primer servicio.

Los aislamientos de *E. coli* en el lumen del útero son asociados con contaminación fecal durante el parto, sin embargo, solo algunas cepas con clústeres filogenéticos, llamadas *E. coli* patógena endometrial (EnPEC), son asociadas con una enfermedad uterina. (Sheldon et al., 2010). Como toda bacteria Gram Negativa los liposacáridos (LPS) son los componentes principales de la pared celular, estos son reconocidos por TLR4 por las células endometriales, una vez activado el TLR4 utiliza la vía dependiente de MyD88 (Cronin et al., 2011). Esa vía resulta en la degradación de I κ B que libera NF- κ B que es translocado al núcleo donde se une a sitios de κ B en la región promotora de genes que codifican citocinas proinflamatorias, como IL-1B, IL-6 e IL-8. (Figura 5), (Fitzgerald et

al., 2001; Cronin et al., 2011). Células endometriales y células del estroma *in vitro* en presencia de LPS secretan PGF_{2α}, Prostaglandina E₂, IL-6, IL-8 e incrementan la expresión de péptidos antimicrobianos MUC1, LAP y TAP. (Herath et al., 2009; Davies et al., 2008). Los TLR1, TLR2 Y TLR6 responden a lipopolipéptidos teniendo como respuesta la secreción de IL-6, IL-8, IL-1B *in vitro*. (Turner et al., 2014).

Otra bacteria asociada a endometritis es *Trueperella pyogenes*. (Wang et al., 2018; Carneiro et al., 2016; Brodzki et al., 2014). Esta bacteria secreta una exotoxina llamada piolisina O (PLO) que causa la lisis celular de eritrocitos, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células endometriales y células del estroma. (Griffin et al., 2018; Rzewuska et al., 2019). PLO pertenece a las citolisinas dependientes de colesterol (CDCs) y hasta ahora el gen (plo) que codifica para esta proteína ha sido detectado en todas las cepas wild-type. (Rzewuska et al., 2019). Las quimiocinas, como IL-8 atrae neutrófilos y macrófagos al sitio de infección o daño tisular, donde estas células hematopoyéticas son reguladas por citocinas como la IL-6 (Hurst et al., 2001). Las células dañadas liberan pasivamente IL-1α intracelular y si las células endometriales liberan proteína IL-1α si hay bacterias o detectan PAMPs.

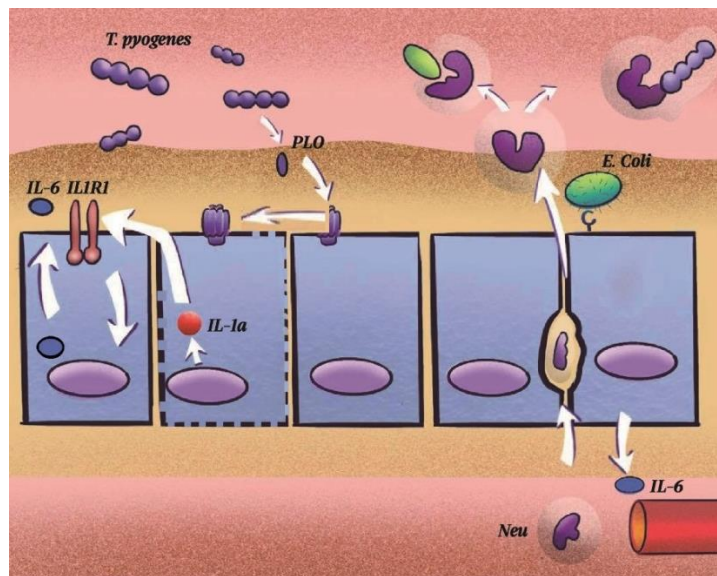


Figura 5. Células endometriales en presencia de dos bacterias potencialmente patógenas. *E. coli* y *T. pyogenes* que secreta piolisina O (PLO) la cual genera un canal y causa lisis celular, activando la producción de interleucina 1 alpha (IL-1α). La IL-1α activa su receptor lo cual conduce a la producción de interleucina 6 (IL-6) funciona como quimio atractor para los neutrófilos (Neu) las cuales fagocitaran bacterias patógenas.

DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA

Se define como microbiota el conjunto de microorganismos que se encuentran generalmente asociados a tejidos sanos (piel, mucosas, etc.) de algún animal, (Universidad de Navarra, 2020) estos residen en los tejidos de forma más o menos permanente y en algunos casos realizan funciones específicas. Diferentes estudios concuerdan en que los filums mayormente encontrados en el útero de bovinos sanos son *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, y *Fusobacterium* siendo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en mayor proporción (Moore et al., 2017; Bicalho et al., 2017b; Jeon, 2015).

-Firmicutes

Firmicutes es un filum gram positivo compuesto por bacterias anaeróbicas facultativas y obligadas, y la mayoría puede formar endosporas, proporcionándoles una ventaja evolutiva para la sobrevivencia en condiciones adversas. (Kim et al., 2017). Las endosporas son estructuras no reproductivas en las que las bacterias se reducen a sí mismas cuando se encuentran en un ambiente estresante; estas estructuras pueden sobrevivir en ausencia de nutrientes y son resistentes al oxígeno, a radiación ultravioleta, desecación, temperaturas extremas y a algunos desinfectantes químicos. Esto le permite a las bacterias sobrevivir durante largos periodos de tiempo para después reactivarse en su estado metabólicamente activo cuando el ambiente sea favorable. (Kim et al., 2017).

-Proteobacteria

Proteobacteria es un filum que comprende una gran variedad de bacterias Gram negativas. La mayoría de estas bacterias que se encuentran en el tracto intestinal son anaerobias obligadas, y algunas son anaerobias facultativas. (Kim et al., 2017). Algunas investigaciones sugieren que el incremento de este filum en la microbiota del intestino puede provocar una disbiosis e incrementar el riesgo a una patología. (Shin et al., 2015).

-Bacteroidetes

Bacteroidetes es un filum gram negativo y está compuesta de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, no formadoras de esporas. (Kim et al., 2017). Esas bacterias también están

presentes en el intestino, y estas mediante la degradación de carbohidratos liberan algunos ácidos grasos volátiles como acetato, propionato y butirato que son absorbidas por el comensal, están implicadas en el crecimiento epitelial, (Levy et al., 2017) así como también son responsables de la diferenciación y estimulación del sistema inmune. (Smith et al., 2013).

-Actinobacteria

Actinobacteria es un filum que al igual que Firmicutes son gram positivas, pero en lo que difiere es que contienen altas cantidades de G+C en su ADN. Este filum está compuesto por bacterias aeróbicas y anaeróbicas. (Kim et al., 2017). Dentro de esta clasificación se encuentran las *Bifidobacterias spp*, que son uno de los mayores géneros encontrados en tracto intestinal. (Rajilic, 2014); se ha considerado que algunas especies tienen efectos probióticos, por lo que están implicadas en la protección de patógenos mediante diferentes procesos incluyendo exclusión por competencia, modulación inmunitaria y por la habilidad de adherirse en el moco del epitelio intestinal. (Buffie et al., 2013; Picard et al., 2005).

PRODUCCIÓN DE MOLÉCULAS ANTIMICROBIANAS

Las bacterias comensales que habitan en el tracto uterino compiten por un nicho invadiendo especies patógenas, este término se le conoce como resistencia por colonización (Buffie & Pamer, 2013). Las bacterias que se encuentran en el útero utilizan nutrientes para su sobrevivencia por lo que disminuyen en el ambiente los nutrientes utilizados por otras especies.

Ciertas bacterias comensales secretan moléculas pequeñas con actividad bacteriostática o bactericida, por ejemplo, en intestino *Enterococcus fecalis* o *Staphylococcus lugdunensis* o *E. coli* cepa Nissle 1917 secretan pequeños péptidos que inhiben el crecimiento de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* resistente a vancomicina o *S. typhimurium*. (Ubeda et al., 2017).

-Producción de peróxido de hidrógeno

La producción de peróxido de hidrógeno ha sido considerada un metabolito producido por bacterias ácido lácticas que puede proteger contra infecciones urogenitales, especialmente en vaginosis bacterianas. (Reid, 2008). La actividad antimicrobiana de este compuesto es debida a su potente efecto oxidante en las células bacterianas que puede llegar a destruir las moléculas estructurales básicas de las proteínas celulares.

-Producción de bacteriocinas

Algunas bacterias ácido lácticas producen bacteriocinas, sustancias proteicas con actividad antimicrobiana contra algunos géneros de bacterias. (Suskovic et al., 2010)

-Producción de dióxido de carbono (CO₂)

El CO₂ tiene una actividad antifúngica ya que se ha observado que inhibe la descarboxilación enzimática y esto provoca la acumulación de lípidos en la membrana resultando en una disfunción en la permeabilidad. Otro mecanismo por el cual el CO₂ tiene un papel antimicrobial es que crea un ambiente anaeróbico por lo que las bacterias aeróbicas se verán perjudicadas (Suskovic et al., 2010).

-Producción de reuterina y reuteriicina

Aislamiento de *Lactobacillus reuteri* producen dos compuestos, reuterina y reuteriicina las cuales son activas en contra de bacterias Gram positivas. Reuteriicina es un derivado del ácido tretamérico y reuterina es una mezcla entre formas de monómero hidratado y dímero cíclico de β -hidroxipropionaldehído que tiene actividad inhibitoria incluyendo protozoarios y hongos (Suskovic et al., 2010).

-Producción de ácido láctico

Las bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* y *Lactococcus* pertenecen al filum Firmicutes, son un género de bacterias gram positivos ácido-tolerantes de las cuales, algunas realizan glucólisis anaerobia a partir del glucógeno de las células endometriales, obteniendo como producto final ácido láctico. Estas bacterias juegan un rol importante en mantener el endometrio saludable, estudios mencionan que en mujeres sanas los filums principalmente encontrados son *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Baker et al., 2018;

Moreno et al., 2016; Tao et al., 2017) así como en bovinos los principales son *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Bicalho et al., 2017b; Jeon et al., 2015; Moore et al., 2017). La concentración de ácido láctico producida por los lactobacilos está estrechamente correlacionado con el pH (O'Hanlon et al., 2013) y muy probablemente con el del útero. El ácido láctico se produce por metabolismo homofermentativo, a partir de hexosas, o metabolismo heterofermentativo, a partir de pentosas o hexosas, dependiendo la especie bacteriana (Gärtner et al., 2015; Zhang et al., 2015). Esto es mediante una enzima llamada lactato deshidrogenasa, la cual utilizando como cofactor $\text{NADH} + \text{H}^+$ transfiere dos H al piruvato dejando como residuo L-Lactato y NAD^+ (Figura 6).

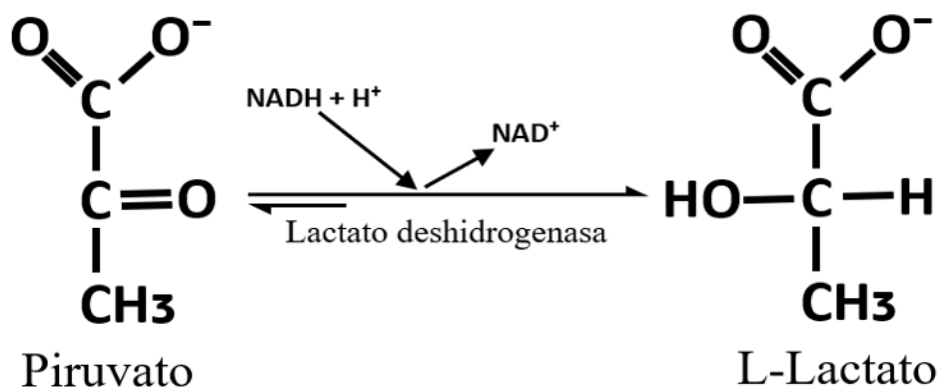


Figura 6. Reducción de piruvato a L-Lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa.

ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

La microbiota desempeña un rol importante en el sistema inmunitario, ya que son las responsables del envejecimiento de los neutrófilos por el constante estímulo de la vía TLR-MyD88. (Zhang, et al., 2015). Todos los TLR; a excepción del TLR3, se activan por esta vía. Una vez activados los receptores tipo toll provoca la unión de MyD88 el cual recluta IRAK1 e IRAK2. IRAK4 activa IRAK1 que posteriormente se autofosforila en diferentes sitios y se libera de MyD88 (Wang et al., 2014). IRAK1 se asocia con TRAF6 y junto con enzimas de conjugación con ubiquitina UBC13 y UEV1A promueve la poliubiquitinación de TRAF, así como del complejo proteína quinasa TAK1. TAK1 se une con TAB1, TAB2, TAB3 que interactúan con la poliubiquitinación formando un complejo activo (Ajibade et al., 2013). Este complejo activa dos vías, la activación del

complejo IKK-NF-Kb (IKK complex-NF- κ B) y la vía MAPK. TAK1 fosforila el complejo y activa IKKB degradando IKKA mediante el proteosoma, una vez libre ikkb se traslada al núcleo para inducir la expresión de genes proinflamatorios.

La otra vía por medio de la familia MAPK, así como ERK1 y JNK que median la activación de factores de transcripción o estabilización de mRNA para regular respuestas inflamatorias. (**Figura 7**), (Kawasaki & Kawai, 2014).

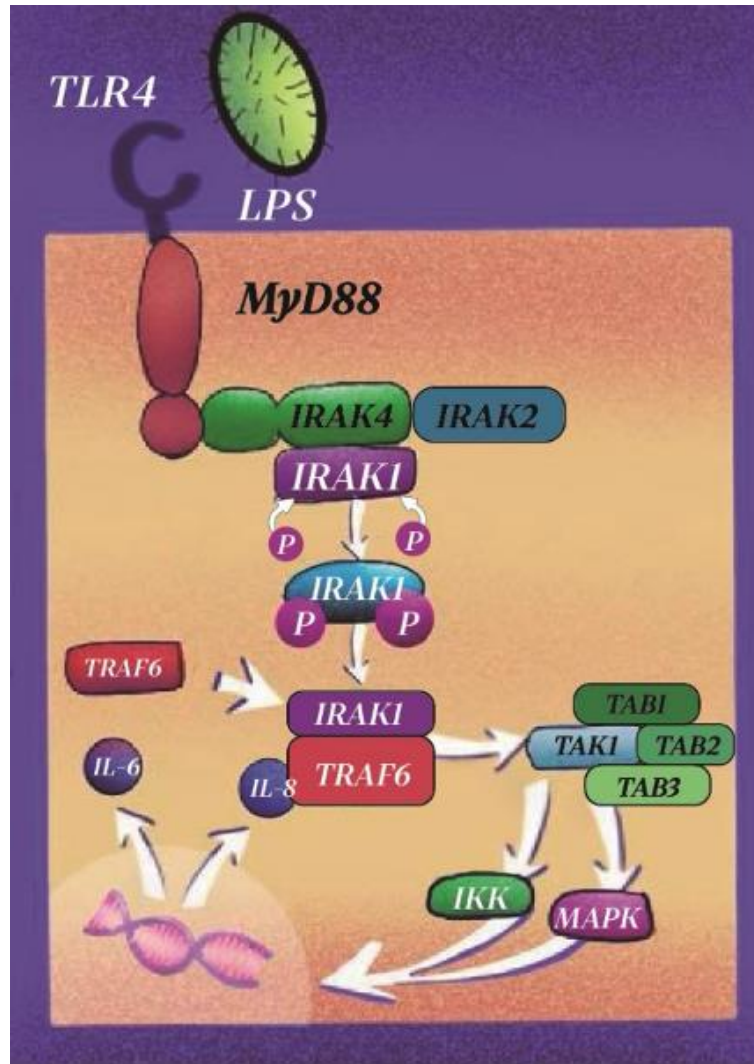


Figura 7. Representación de la Activación de la vía de señalización TLR/MyD88.

MICROBIOTA EN LA IMPLANTACIÓN

Dentro de la fisiología de la reproducción animal la implantación es indispensable para el desarrollo del embrión pues es un proceso complejo en el cual el embrión se fija en la pared uterina de la madre mediante diferentes mecanismos. Existe una comunicación entre el embrión y el útero y ésta es esencial para el desarrollo embrionario y lograr la preñez.

El embrión bovino llega al útero en estadio de mórula, aproximadamente en el día 4 de preñez. Durante los siguientes tres días las células se siguen dividiendo y compactando hasta convertirse en blastocisto, el cual contiene una masa celular interna que dará lugar al feto, así como el trofoectodermo, que dará lugar a la placenta. En el día 8-9 el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida, cambiando su morfología esférica por una forma ovoide en donde el trofoectodermo se va alargando en forma filamentosa entre el día 12-14. (Spencer T. & Hansen T. 2015). El trofoectodermo secreta hCG que provee una señal directa para las células epiteliales del endometrio. Las células del trofoectodermo migran entre las células del endometrio desplazándose y penetrando hasta su membrana basal. El proceso de implantación se puede dividir en tres pasos: aposición, adhesión e invasión. La aposición es facilitada por protrusiones de las células epiteliales llamadas pinopodos, las cuales rodean la fosa en las glándulas endometriales. El embrión realiza un anclaje a las glucoproteínas celulares y consiguientemente la adherencia por mucinas. Una vez que las moléculas de adhesión entre el blastocisto y el útero están unidas, las células del trofoblasto se adhieren a las células del endometrio, muchas familias de adhesión están envueltas en este mecanismo como las integrinas, tastinas, proteoglucanos heparán sulfato, glicanos y cadherinas. El último paso es la invasión. El trofoblasto se empieza a diferenciar y el endometrio se transforma (decidua), las células del trofoblasto invaden el tejido uterino estableciendo de esta manera una comunicación entre el feto y la madre por medio de capilares que le son útiles para desechar residuos y obtener nutrientes. (Cha et al., 2012; Elder et al., 2011).

El periodo de implantación está caracterizado por el incremento de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, LIF y TNF α con implicaciones en el reclutamiento y

activación de células inmunes del endometrio, los linfocitos CD56bright, CD16dim, y las células eNK secretan IFN γ , TNF α y factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina 10 (IL-10).

La presencia de bacterias comensales puede alterar el balance de células T en la mucosa, y las citocinas que esta genera puede afectar al ambiente inmunitario, por lo que son importantes en una implantación y placentación sana, ya que la presencia de la microbiota las células uNK son potencialmente afectadas (Benner et al., 2018)

Se ha demostrado que la implantación disminuye 23.1 vs 60.7% y en tasas de preñez declinan 13.3 vs 58% cuando las mujeres muestran un endometrio que no está dominado por lactobacillus. (Benner et al., 2018). Existen dos maneras en que estas bacterias puedan tener influencia en la implantación; La primera está relacionada al sistema inmune pues, la microbiota existente en el endometrio compite por su nicho contra los agentes patógenos creando así resistencia por colonización, y por otro lado las bacterias comensales continuamente están estimulando la regulación de TLR para detectar bacterias potencialmente peligrosas; de esta manera protege al hospedero de posibles infecciones. ya que se ha observado que la microbiota no dominante en lactobacillus puede desencadenar una respuesta inflamatoria en el endometrio que afecte la implantación del blastocisto a la pared del endometrio (Buffie et al., 2013; Costello, 2012; Moreno et al., 2016), mientras que la segunda está relacionada a la producción de ácido láctico por los lactobacillus (Witkin & Linhares 2017).

SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

La secuenciación es una serie de procesos biológicos, la cual, nos permite determinar el orden de nucleótidos en una secuencia genética. La metodología utilizada en el siglo pasado son conocidas como de primera generación, esta es la técnica de Sanger desarrollada en 1977, (SigmaAldrichs, s.f.).

Las técnicas de segunda y tercera generación o “nueva generación” son las que utilizan tecnologías de alto rendimiento, que permiten la secuenciación simultánea de múltiples segmentos de ADN en una muestra. Esto se realiza mediante secuenciación paralela de

pequeños fragmentos los cuales se alinean con una secuencia de referencia. (Robin & Farmer, 2018; Rodicio, 2004). Existen diferentes plataformas y equipos actualmente que desarrollan estas técnicas como Illumina, Mini On, HeliScope. (Bicalho et al., 2017a; Suarez, 2017; Thompson & Steinmann, 2010). Éstas a su vez son utilizadas para diferentes fines como secuenciar el genoma completo, determinar un polimorfismo en una secuencia específica y metagenómica, que se detalla a continuación. (Alves et al., 2020; Cochran et al, 2013; Demiral et al, 2015; Bicalho et al., 2017a; Santos et al., 2011).

La metagenómica es el estudio de las comunidades bacterianas, partiendo del ADN obtenido de muestras provenientes de suelo, agua, alimentos fermentados o tejidos, sin necesidad de que sean cultivadas. Para determinar la microbiota se comienza con la extracción y purificación de ADN, este paso es crucial ya que, si la muestra contiene presencia de melanina, sales biliares, ácido húmico o flúvico, llegan a inhibir la actividad de la ADN polimerasa, ligasa y endonucleasas. (Cortés et al., 2014; Suarez 2017).

Las proteínas cambian a lo largo del tiempo debido a mutaciones aleatorias que ocurren en las secuencias que las codifican, sin embargo, existen macromoléculas que debido a sus funciones tan específicas e importantes no sufren cambios significativos ya que esto costaría el correcto funcionamiento celular. Es por esta razón que el gen más ampliamente utilizado es el ARNr 16S, ya que se encuentra en todos los organismos conocidos, tiene una baja tasa evolutiva pero aun así tiene suficiente variabilidad para diferenciar no solo organismos más alejados, sino también los próximos, por lo que es posible diferenciar especies, cepas o variedades. (Valenzuela et al., 2015). El ARNr 16S contiene nueve regiones menos conservadas o hipervariables (Baker et al., 2003) las cuales aportan más información para estudios de filogenética y taxonomía.

PROTOCOLO DE ESTRÓGENOS-PROGESTÁGENOS EN GANADO DE CARNE

La sincronización de estros es una técnica que consiste en la manipulación del ciclo estral para acortarlo y agrupar a las vacas para inseminarlas el mismo día, con el fin de que el parto sea en una fecha determinada por el operador. Uno de los protocolos más

utilizados es el uso de un implante intravaginal impregnado de progesterona combinado con dosis de estrógenos (Benzoato de estradiol o estradiol-17 β) en el día 0, esta combinación suprime la FSH y la liberación de la LH, por lo que reduce el crecimiento folicular. El estradiol se metaboliza en el hígado con rapidez, posteriormente aumenta la FSH en circulación lo que provoca una nueva oleada folicular 4 días después del tratamiento. (Malgor & Valsecia 2000; Colazo, 2014). La duración del dispositivo suele variar, siendo desde 5 días hasta 9 días. (Rodríguez et al., 2018; De la Mata & Bó 2012). La adición de gonadotropina coriónica equina en los tratamientos con progesterona y estrógenos estimula el crecimiento del folículo dominante que permite tener mayor tasas de preñez en los protocolos. (Sá Filho et al., 2010)

La inseminación artificial a tiempo fijo se realiza entre las 48-54 horas después de retirado el dispositivo intravaginal. Las tasas de preñez en el norte de México son variables, 24%, 46% y 47% esto en vacas Simmental mantenidas en agostadero. (Ledezma et al., 2015).

JUSTIFICACIÓN

La tasa de preñez en el norte del país oscila entre el 47-50% en el primer servicio de IA utilizando un protocolo de progestágenos y prostaglandinas (Ledezma et al., 2015).

Así mismo se desconoce la prevalencia de endometritis subclínica en ganado de carne en México.

Esta investigación aportará información necesaria para determinar si existe una relación entre la microbiota uterina y la gestación, esto con el fin de mejorar las tasas de preñez que existen actualmente, así como poder crear protocolos para mantener la microbiota uterina equilibrada.

HIPÓTESIS

La dominancia de algunas poblaciones bacterianas en el útero de bovinos está relacionada con un incremento del porcentaje de gestación en el primer servicio.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la microbiota del útero en bovinos de carne en el día 0 y 8 de un protocolo de sincronización de estrógenos-progestágenos y asociar estas poblaciones bacterianas a la tasa de gestación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la prevalencia de endometritis subclínica en bovinos de carne.
2. Secuenciar la región hipervariable V4.
3. Comparar las poblaciones bacterianas del útero del día 0 y día 8 del protocolo de sincronización.
4. Definir si la microbiota tiene efecto en parámetros reproductivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA Y TIEMPO DE MUESTREO

El estudio se realizó en el Centro de Investigación en Producción Agropecuaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León ubicado en la Carretera Monterrey - Cd. Victoria Km 145, Linares, Nuevo León México, con latitud 24.79367 y longitud -99.54482. Las muestras fueron tomadas en el mes de enero y febrero del 2020 con una temperatura promedio de 17.5°C.

Para el estudio fueron utilizadas 38 vacas (Simmental=24 Simbrah=14) con un media general en la evaluación de la condición corporal (Unidades) de 4 ± 0.54 DE de las cuales dos no culminaron el estudio, por venta y muerte, otra fue excluida por valor atípico. Teniendo como valores de exclusión: vacas con menos de 50 días post parto, vacas que mostraran descargas vaginales mucopurulentas, animales que estuvieron en tratamiento con antibióticos o desinflamatorios en las últimas dos semanas.

El estudio fue sometido y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

MANEJO ANIMAL

Los animales fueron movilizados de manera que no se generará estrés, evitando choques eléctricos al momento de arrearlos a la manga, una vez dentro de esta, se desplazan hasta llegar a la prensa en donde son inmovilizados con una prensa, donde se realiza el muestreo citológico, el escaneo ultrasonográfico y el inicio del protocolo de sincronización.

PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN

Se utilizó un protocolo de IA a tiempo fijo, en el cual el primer día (se introdujo un dispositivo intravaginal con 1.9 g de progesterona y se administró 2 mg de benzoato de estradiol vía I.M., a los 8 días se retiró el dispositivo y se administraron 25 mg de PGF_{2α} vía I.M. (Dinoprost trometamina) y 400 U.I. de eCG vía intramuscular. El día 9 se inyectó 1 mg de benzoato de estradiol vía intramuscular, al cabo de 24 horas se realizó la inseminación a tiempo fijo. (**Figura 8**) Se realizó el diagnóstico de gestación utilizando un transductor multifrecuencia con un ultrasonido ALOKA Prosound en forma transrectal al día 40 post inseminación.

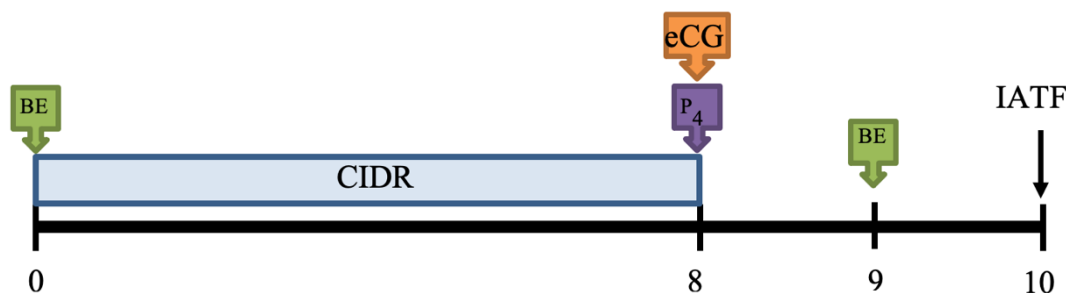


Figura 8. Protocolo de sincronización a base de progestágenos y estrógenos de 8 días.

MUESTRA CITOLÓGICA

Se adaptó una pistola de Inseminación Artificial realizándole un roscado en la parte final



de la varilla más delgada. (

Figura 9). El instrumento se prepara colocando el citocepillo en la parte superior y se esconde dentro de la pistola, posteriormente se le coloca una manga protectora (Madoz et al., 2013; Vallejo et al., 2014). Se realizó una limpieza alrededor de la vulva con clorhexidina y alcohol al 70% y se secó con papel secante; se introdujo la pistola por la vagina con una inclinación de 45° hacia arriba, para evitar la introducción en el orificio uretral, y posteriormente se siguió recto, la manga protectora se rompió una vez encontrando la entrada del cérvix, una vez atravesando los anillos cervicales y estar en la curvatura mayor del cuerno uterino se empuja la varilla delgada dejando expuesto el citocepillo y se giró en dirección a las manecillas del reloj, después de obtener la muestra se procede a realizar un frotis en un portaobjetos, el cual se fijó por inmersión en alcohol al 95% durante 1 minuto. Las laminillas se tiñeron 72 horas después mediante la técnica de Diff Quick y se analizaron bajo el microscopio, realizando un conteo de 200 células endometriales y obteniendo la proporción de polimorfonucleares (PMN) utilizando la fórmula de $\#PMN \times 100 / 200$ (Barajas et al., 2018).



Figura 9. Pistola de inseminación artificial adaptada para muestra citológica vaginal en vacas.

Para el análisis citológico se descartaron 6 vacas por las siguientes causas: muerte (1), venta (1), frotis no viables (3) y otra no tenía registrada la fecha de su último parto (1), dejando un total de 32 vacas. Los animales se clasificaron en dos grupos de acuerdo con sus días postparto (dpp) siendo el grupo 1 las vacas con <100 dpp ($n= 15$) y en el segundo grupo vacas con >100 dpp ($n=17$). Para determinar si el análisis citológico en las vacas ($n=32$) se distribuyó normalmente tomando como variable independiente los días post-parto, se analizó mediante un qqplot en el programa SPSS (IBM SPSS Statistics 22.0).

MUESTRA MICROBIOLÓGICA

El método mediante el cual fueron obtenidas las muestras del útero fue con la técnica de citocepillo adaptado en grandes especies. (Madoz et al., 2013; Vallejo et al., 2014). El cepillo fue cortado quedando a una longitud de 3 cm que se enrosca a la varilla modificada de la pistola de inseminación. El instrumento se colocó en una manga protectora de plástico para proteger de contaminación vaginal, la vulva se limpió con clorhexidina y alcohol al 70% y se secó con papel secante, el instrumento pasa por la vagina llegando a la entrada del cérvix en donde se punza la manga protectora y se

procede a pasar el cérvix, cuando la pistola estaba situada en el útero se presiona la varilla delgada exponiendo el citocepillo. Las muestras son colectadas rodando el citocepillo en dirección de las agujas del reloj en contacto con la pared uterina, el cepillo es nuevamente retraído para el retiro del útero. (Vallejo et al., 2014). El citocepillo es introducido a un criotubo el cual fue sumergido en nitrógeno líquido y después fue almacenado a -80°C. El muestreo microbiológico se realizó en el día 0 y en el día 8 del protocolo de sincronización. (Figura 10).

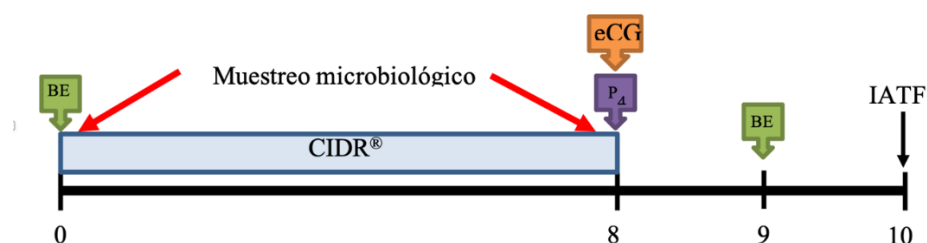


Figura 10. Tiempos en los que se realizaron los raspados uterinos para la secuenciación.

EXTRACCIÓN DE ADN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S

Para determinar la microbiota presente en las muestras se amplificó por PCR la región **16S-V4** (primers V4-515f y V4-806r 1) con adaptadores Illumina. (Carpuraso et al., 2011). A los productos finales se le adicionaron índices conforme al protocolo recomendado por Illumina. Finalmente, las muestras se cuantificaron en Qubit y se mezclaron en un pool equimolar para ser secuenciadas en el equipo Miniseq de Illumina en condiciones estándar (300 ciclos, 2X150). Las muestras con bajo número de secuencias en la primer corrida, se resecuenciaron.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Se analizaron 50 muestras con un total de 1,557,675 secuencias en formato fastq en la primer corrida y 13 muestras resecuenciadas en la segunda corrida con 547,860 secuencias. Algunas muestras se quedaron fuera del análisis porque no se pudieron obtener más de 10,000 secuencias.

Se realizaron tres procesos bioinformáticos básicos:

1. Limpieza de secuencias con pair-end_cleaner v1.1.1 por separado para las dos corridas
2. Eliminación de secuencias quiméricas con chimera_detector v1.5.0
3. Clasificación de las secuencias en taxones con mg_classifier v1.8.2

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utiliza prueba estadísticas no paramétricas, ya que la variable dependiente gestación o no, de las vacas utilizadas como unidades experimentales, es una calificación, la cual no se distribuye normalmente o existen algunos datos muy distantes del conjunto general, por lo que no se cumple con la suposición de varianzas homogéneas, como variables independientes se consideraron días abiertos, raza, condición corporal, porcentaje de polimorfonucleares, diagnóstico de endometritis subclínica, actividad ovárica y gestación a primer servicio. Se realizaron diferentes pruebas, t de student, prueba de muestras pareadas, prueba U de Mann-Whitney. Para este propósito se utilizó el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics 22.0) así como en Microsoft Excel.

Para el análisis de la prevalencia de endometritis subclínica se utilizó el algoritmo de WinEpi.

RESULTADOS

CITOLOGÍA ENDOMETRIAL

El conteo celular resultó en 2 animales con un incremento en polimorfonucleares que se muestra en la **Figura 11**, tomando como punto de cohorte >8% PMN basado en la literatura.

El promedio de los dpp es de 166.5 ± 138.27 DE, no se encontró diferencia ($p=0.45$) en los grupos utilizados en la distribución del porcentaje de los polimorfonucleares en la citología uterina.

No se encontró diferencia ($p=0.35$) entre los grupos de vacas en fase lútea o folicular para la variable dependiente del porcentaje polimorfonucleares al inicio del programa de sincronización.

No existe diferencia ($p=0.27$) entre raza Simmental y Simbrah para la variable de los polimorfonucleares en la citología.

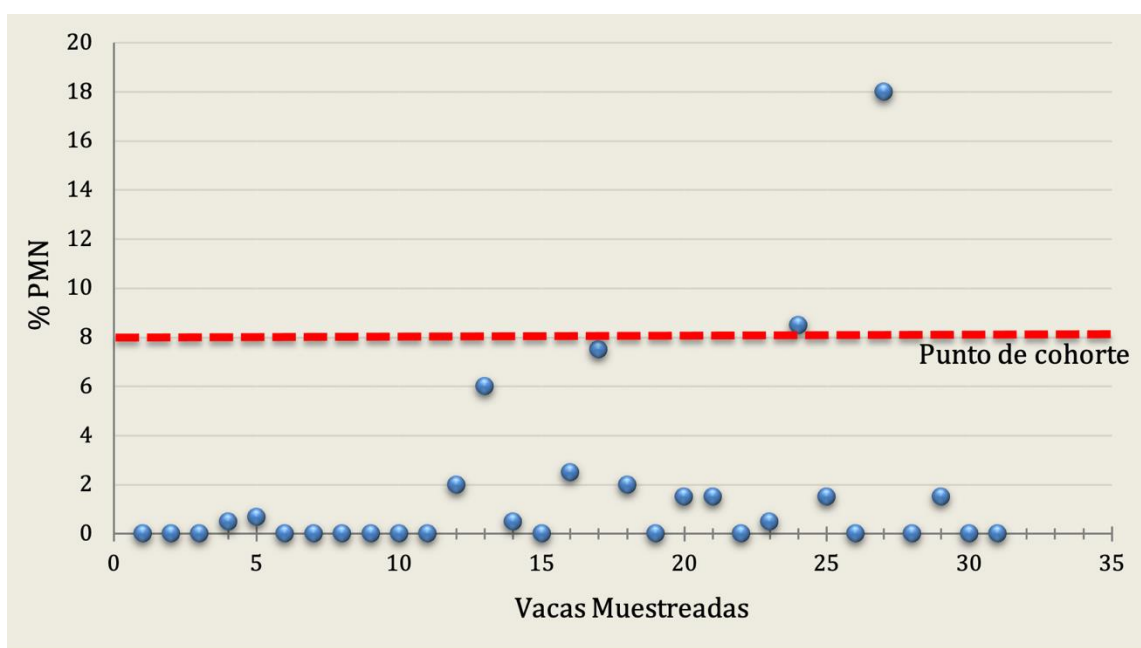


Figura 11. Distribución del conteo de polimorfonucleares en los animales muestreados.

PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA

La prevalencia aparente de endometritis subclínica en ganado de carne es de 6.25% y prevalencia real de 2.27% con un nivel de confianza de 95%, con una sensibilidad de 60% y una especificidad del 95%.

Se obtuvo un 40% de preñez en el primer servicio (14/35)

CARACTERIZACIÓN GENOMICA DE LA MICROBIOTA UTERINA

Se lograron identificar a partir de la secuenciación 33 filums diferentes de las muestras uterinas. De las cuales son 6,146 especies diferentes. La información obtenida, se sintetizo en los filums más abundantes encontrados.

Los 14 filums más abundantes en las muestras tomadas en el día 0 (al inicio del protocolo de inseminación) en ese orden fueron: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Archea*, *Kiritimatiellaeota*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes* y con menos o igual al 1% *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Lentisphaerae* y *Fusobacteria*. La abundancia relativa de estos filums se muestra en la

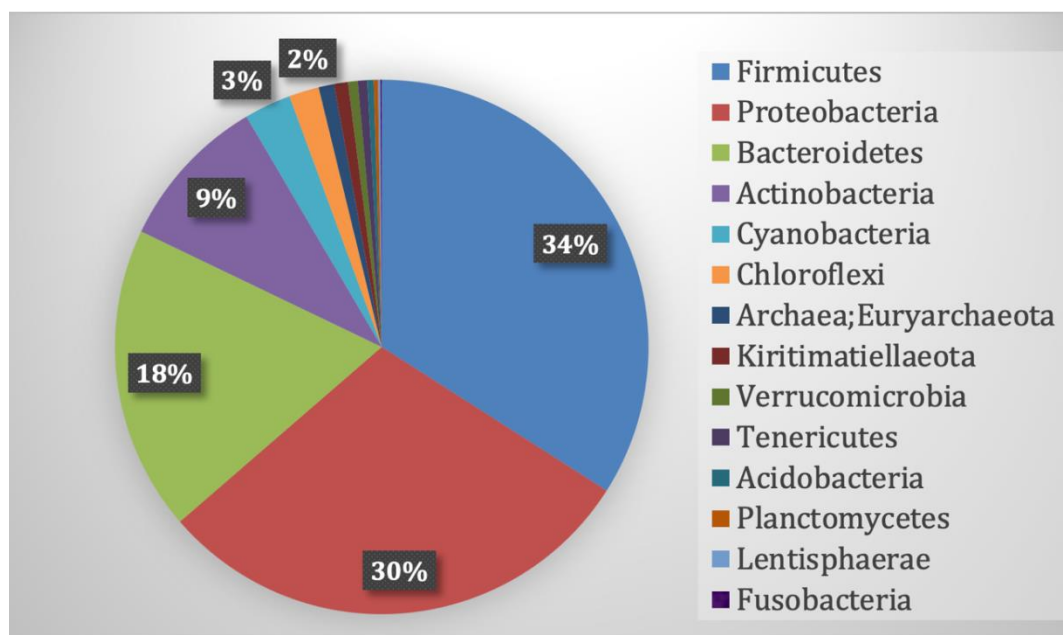


Figura 12. Abundancia relativa en el día 0 del protocolo de inseminación.

Los 14 filums más abundantes en las muestras tomadas en el día 8 (en el momento del retiro del CIDR) fueron en ese orden: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Kiritimatiellaeota*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, y con menor o igual al 1% *Tenericutes*, *Cyanobacteria*, *Archea;echo*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes*. La abundancia relativa de estos filums se muestra en la **Figura 13**.

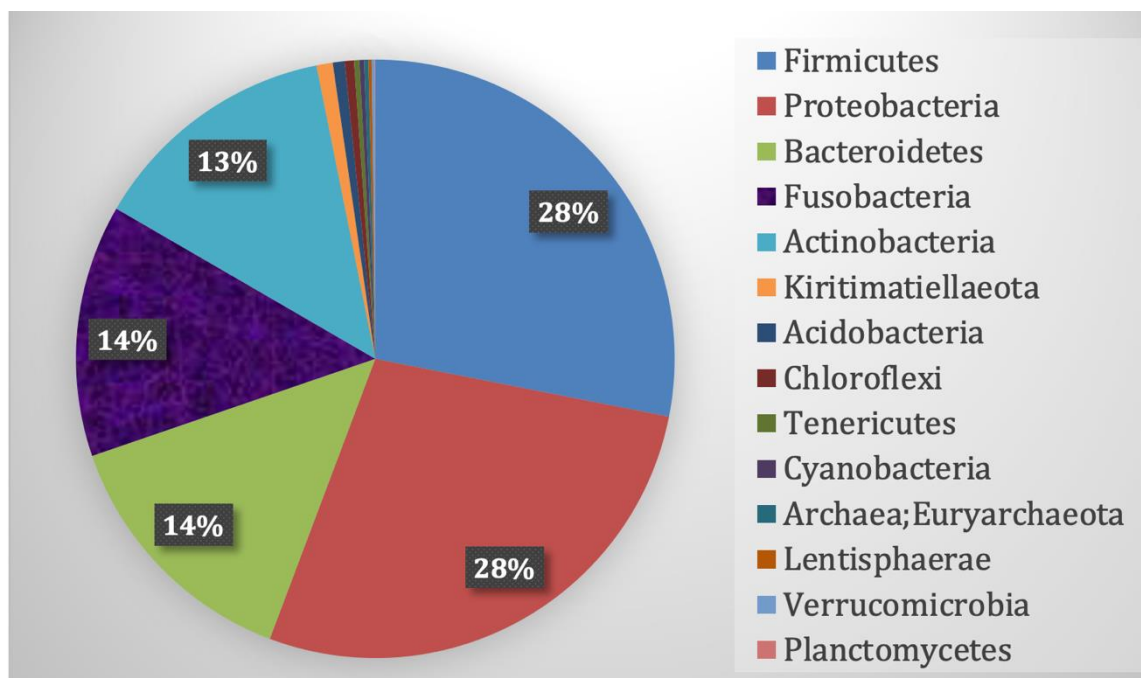


Figura 13. Abundancia relativa en el día 8 del protocolo de inseminación.

Los incrementos y disminución de OTUs de los filums *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* y *Actinobacteria* fueron sometidos bajo una prueba de muestras pareadas, en el cual se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) en *Fusobacteria*(

Tabla 1).

Tabla 1. Prueba de muestras apareadas para los filums con mayor cambio entre las tomas de muestra citológica durante un protocolo de sincronización de estros usando progestágenos

Prueba de muestras apareadas								
		Diferencias apareadas				t	df	Sig. (2- colas)
		Media	Desviación estándar	95% intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1	Firmicutes_0- Firmicutes_8	-1370.4	19246.8	-10941.6	8200.7	-0.302	17	0.766
Par 2	Fusobacteria_0- Fusobacteria_8	-6156.5	10740.4	-11497.6	-815.3	-2.432	17	0.026
Par 3	Bacteroidetes_0- Bacteroidetes_8	-100.0	8944.9	-4548.2	4348.1	-0.047	17	0.963

Par 4	Actinobacteria_0-Actinobacteria_8	-3650.5	9351.8	-8301.1	1000.0	-1.656	17	0.116
Par 5	Proteobacteria_0-Proteobacteria_8	-4571.5	13982.3	-11524.7	2381.7	-1.387	17	0.183

En la **Figura 14**, se observa una tendencia en la distribución en la microbiota uterina entre las vacas preñadas y vacías y en los resultados de las pruebas no paramétrica ejecutadas en el software SPSS, utilizando como variable el diferencial de OTUs entre las vacas para los filums con mayor cambio porcentual entre el día 0 y 8 del protocolo de sincronización de ciclo estrual mostrado *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* y *Actinobacteria* () se encontró que la distribución de la diferencia entre los muestreos para el filum de las fusobacterium entra las preñadas es significativa ($p < 0.05$)

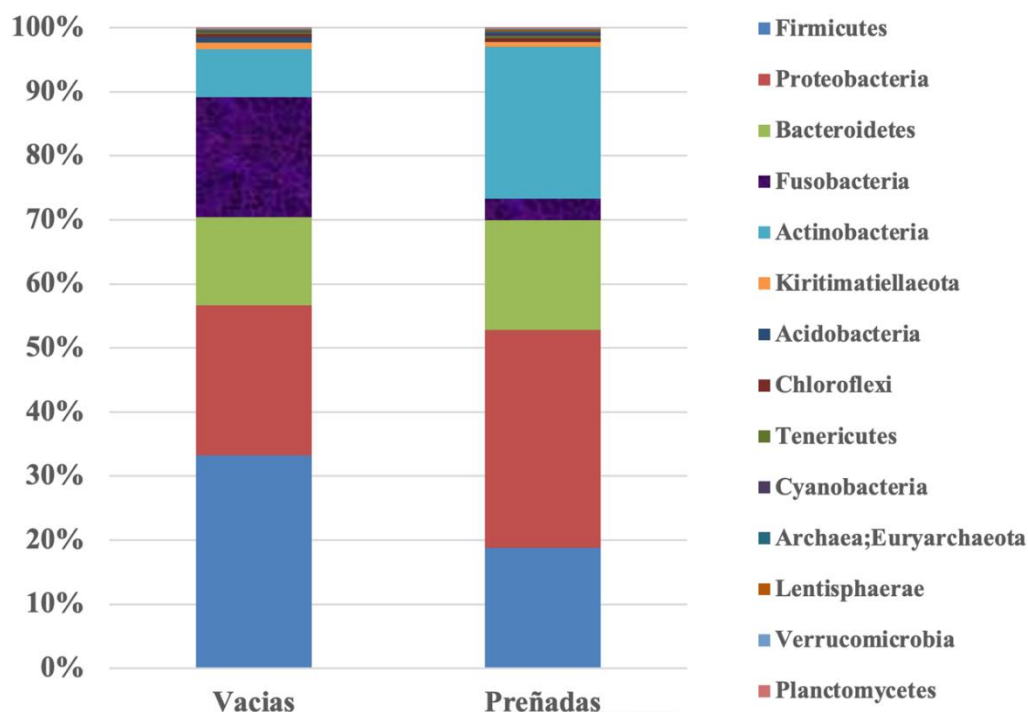


Figura 14. Comparación de abundancia relativa del día 8 de las vacas vacías y preñadas.

Tabla 2. Sumario de las Hipótesis para pruebas no paramétricas

	Hipótesis Nula	Test	Sig.	Decisión
I	La distribución de la diferencia en las OTU en el día 0 y 8 de fusobacteria es la misma a través de la categoría de preñez	Prueba muestras independientes Mann-Whitney U	.030 ¹	Rechazar hipótesis nula

Se muestran significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

¹ Se muestra la significancia exacta en esta prueba.

DISCUSIÓN

Endometritis subclínica

La información de la prevalencia de endometritis subclínica es muy escasa en el ganado de carne y varía enormemente dependiendo el lugar, en Italia Ricci et al. obtuvieron un 38% con vacas entre el día 28-68 post parto en raza Piedmontese. En Malasia, Salah et al. obtuvieron un 9.4 y 11.3% en vacas Brangus-Kedah–Kelantan con 37 y 30 días post parto, respectivamente. Estos estudios utilizando como punto de cohorte >8% de PMN.

La prevalencia aparente encontrada en nuestro estudio fue de 6.25% que es menor a la mostrada a los autores anteriormente mencionados, sin embargo, cabe resaltar que los días post parto de este estudio fueron en el rango desde 58-623.

Días post parto

En este grupo de estudio, el promedio de días post parto fue de 166.5 días. En Bogotá, Colombia obtuvieron un promedio de días abiertos alrededor de 83 días, donde la mayoría de las vacas (14/17) tuvieron un rango entre 37 y 120 días en raza Simbrah. (Acosta Rueda; 2017).

Este grupo estuvo encima del parámetro recomendado, para los días abiertos, que significa menor eficiencia en la producción de una cría por vaca al año, se asume derivado de la función de este hato en particular en que al ser de registro de pureza racial, debe de estar compitiendo en pista y permanecer por periodos cortos de tiempo en diferentes lugares sometidas a un estrés general, que se traduce en dificultades para ser gestadas nuevamente.

Microbiota Uterina

Existen diferentes técnicas con las cuales se pueden realizar estudios sobre la microbiota uterina, una de ellas es mediante lavados uterinos con solución salina estéril (Knudsen et al., 2015; Wang et al., 2018), sin embargo, la adición de solución salina puede alterar la pared celular o el material genético resultando en valores anormales. Otra técnica poco utilizada es mediante biopsias uterinas, que gracias a una pistola larga y en el final contiene unas pinzas que cortan una porción de tejido uterino. (Rødtness et al., 2015;

Cardoso et al. 2017). La gran desventaja de esta técnica es que laceran la pared uterina al tomar la biopsia alterando el microecosistema y generando el desarrollo de inflamación y migración de neutrófilos a la zona dañada lo cual altera la microbiota en días posteriores.

Con la técnica de citocepillo (cytobrush), se han obtenido mejores resultados para fines de secuenciación de las poblaciones bacterianas presentes. (Cardoso et al. 2017; Mitra et al., 2017; Peter et al., 2018; Gärtner et al., 2015).

Algunos autores han secuenciado muestras citológicas uterinas en bovinos en diferentes circunstancias, la proporción de *Fusobacteria* en vacas con metritis es mayor que en vacas sanas, 29.4% y 8% respectivamente. *Bacteroidetes* de igual manera existen en mayor abundancia en vacas con metritis, siendo 15%, y 6% para vacas sanas (Bicalho et al. 2017b). Esto da soporte a que ciertos filums como *Fusobacteria* o *Bacteroidetes* son patógenos potenciales desarrollando infecciones clínicas que disminuyen la fertilidad de las hembras. En los resultados obtenidos, se observa un incremento entre el día 0 y el día 8 de *Fusobacterium*, este incremento puede ser explicado porque en la introducción de la pistola de inseminación se arrastra bacterias, desde la vagina hacia el lumen uterino. El hallazgo de que existe mayor proporción de *Fusobacterias* en las vacas vacías, que en las preñadas, sugiere que este filum causa problemas clínicos de endometritis, variable que afecta en la fertilidad. Lo expuesto resalta la importancia que tiene un protocolo de bioseguridad eficiente, al momento de realizar la inseminación. para evitar introducir bacterias dentro del útero y disminuir la fertilidad en las vacas.

Moore et al. en el 2017, secuenciaron muestras de vacas preñadas en donde encontraron 3 filums más abundantes siendo *Firmicutes* 35%, *Bacteroidetes* 42% y *Proteobacteria* 23% de igual manera los 3 filums mas abundantes en novillas vírgenes fueron *Firmicutes* 40%, *Bacteroidetes* 36% y *Proteobacteria* 10%. En donde se encuentran diferencias con los hallazgos en esta investigación, en relación a los tres filums más abundantes en las vacas durante el día 8 del muestreo en las vacas que posteriormente fueron determinadas como preñadas y que son *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*, con 44%, 31% y 24% respectivamente.

CONCLUSIONES

El incremento de *Fusobacteria* en el día 8 del muestreo, resulta en una disminución del porcentaje de preñez.

La prevalencia aparente de endometritis es de 6.25% y la prevalencia real de 2.27%.

Los tres filums mas abundantes son Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes para ambos días de muestreo.

La distribución de la diferencia en porcentaje del filum *Fusobacteria* el día 0 y el día 8 del muestreo, es significativamente diferente, entre las vacas posteriormente diagnosticadas como vacas preñadas y no preñadas.

El promedio de los dpp de la unidades muestrales utilizadas en esta investigación es de 166.5 ± 138.27 DE, lo que se encuentra por encima de los paramtros considerados normales para esta variable.

No se encontró diferencia en los grupos utilizados en la distribución del porcentaje de los polimorfonucleares en la citología uterina, por lo cual la endometritis no se considera una variable diferente entre los grupos analizados.

No existe diferencia entre las vacas de raza Simmental o Simbrah para la variable de los polimorfonucleares en la citología.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Rueda, K. S. 2017. *Desempeño productivo y reproductivo en la raza Simbrah en San Sebastián de Piedras, Tolima, finca La Eneyda*. Recuperado el 15 de marzo de 2020. Recuperado de https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/132
- Adams PG, Singh J. 2015 Capitulo 24: Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle en *Bovine Reproduction* edited by Richard M. Hopper. USA.
- Alves G, Júnior F, Oliveira HN, Carvalheiro R. (2020). Whole-genome sequencing provides new insights into genetic mechanisms of tropical adaptation in Nellore (*Bos primigenius indicus*). *Scientific Reports*, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-020-66272-7>
- Ajibade AA, Wang HY, Wang RF. 2013 Cell type-specific function of TAK1 in Innate immune signaling. *Trends in Immunology*, 34:307. 1610.1016/j.it.2013.03.007
- Arai M, Yoshioka S, Tasaki Y, Okuda K. 2013. Remodeling of bovine endometrium throughout the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 142(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.08.003>
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *The Journal of Microbiological Methods*, 55: 541–555
- Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. 2018. Uterine microbiota: Residents, tourists, or invaders? *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00208>
- Barajas, JL, Hernandez J, Garcia A, Martinez E, Juarez, NO, Bedolla MA, & Luzbel R. 2018. Endometritis subclínica y tasa de gestación en vacas lecheras en México Subclinical endometritis and pregnancy rate in dairy cows in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9, 135–146. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4324>

- Behjati S, Tarpey PS. 2013. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education & Practice*, 98, 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Benner M, Ferwerda G, Joosten I, Van der Molen, RG. 2018. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human Reproduction Update*, 24(4), 393–415. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy012>.
- Bicalho, M. L. S., Machado, V. S., Higgins, C. H., Lima, F. S., & Bicalho, R. C. 2017. Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(5):3850–3862. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12058>
- Bicalho MLS, Machado VS, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. 2017. Genetic and Functional Analysis of the Bovine Uterine Microbiota. Part II: Purulent Vaginal Discharge versus Healthy Cows. *Journal of Dairy Science*, 100(5): 3863–74.
- Bogado P O, Opsomer G. 2017. Diagnosis and Treatment of Postpartum Uterine Diseases in Dairy Cows: A review with emphasis on subclinical endometritis. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 7(1), 29–40. <https://doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2017.07.01.29-40>
- Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Lisiecka U. 2014. Determination of selected parameters for non-specific and specific immunity in cows with subclinical endometritis. *Animal Reproduction Science*. 148:109-14.
- Buffie, Charlie G, Eric GP. 2013. Microbiota-Mediated Colonization Resistance against Intestinal Pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 13(11): 790–801. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3535>.
- Cardoso B, Oliveira ML, Pugliesi G, Batista EOS, Binelli M. 2017. Cytobrush: A tool for sequential evaluation of gene expression in bovine endometrium.

- Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 1153–1157.
<https://doi.org/10.1111/rda.13037>
- Carneiro LC, Cronin JG, Sheldon IM. 2016. Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. *Reproductive biology*, 16(1);1-7. doi: 10.1016/j.repbio.2015.12.002
- Cha J, Sun X, Dey SK. 2012. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine*, 18(12), 1754–1767.
<https://doi.org/10.1038/nm.3012>
- Clark WA, Stevenson WG. 1949. The Bacterial Flora of the Normal Non-Gravid and Gravid Bovine Uterus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 13 (4).
- Cochran SD, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ. 2013. Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *BMC Genomics*, 14-49 <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-49>
- Colazo MG, Mapletoft RJ, Martinez MF, Kastelic JP. 2007. El uso de tratamientos hormonales para sincronizar el celo y la ovulación en vaquillonas. *Ciencia Veterinaria*, 9: 4–19.
- Conklin RL, McCarthy JB, Thompson RR, Pugsley LI. 1931. Clinical, bacteriological and physio-chemical studies of the pregnant bovine uterus. *Cornell Vet* 1931;21: 177e87.
- Cortés LN, Montor AJ, Olvera CC, Peña CJ, Moral S. 2014. Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1 (7)
- Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJ, Relman DA. 2012. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* 336:1255–1262

- Cronin JG, Turner ML, Goetze L, Bryant CE, Sheldon IM. 2011. Toll-Like Receptor 4 and MYD88-Dependent Signaling Mechanisms of the Innate Immune System Are Essential for the Response to Lipopolysaccharide by Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium. *Biology of Reproduction*, 86, (2).1-9 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092718>
- DeMay RM. 2011. *The art and science of cytopathology*. American Society for pathology 2nd Edition. Vol. 4
- Demiral İ, Doğan M, Bastu E, Buyru F. 2015. Genomic, proteomic and lipidomic evaluation of endometrial receptivity. *Turkish Journal Of Obstetrics And Gynecology*, (4), 237–243. <https://doi.org/https://doi.org/10.4274/tjod.98475>.
- Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO. 2008. Toll- 2 like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 6:53.
- Dawson, F. L. M. 1959. The normal bovine uterus physiology, histology, and bacteriology. *Veterinary. Reviews. and Annotations*, 5, 73-89.
- Dosiou C, Giudice LC. 2005. Natural Killer Cells in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Loss: *Endocrine and Immunologic Perspectives*. 26(1), 44–62. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0021>.
- Elder K, Dale B. 2011. *In-Vitro Fertilization* (3rd ed.). Ney York: Cambridge.
- Elmetwally MA. 2018. Uterine Involution and Ovarian Activity in Postpartum Holstein Dairy Cows. A Review. *Journal of Veterinary Healthcare*, 1(4), 29–40. <https://doi.org/10.14302/issn.2575-1212.jvhc-18-2447>.
- Espejel MC, and A Medrano. 2017. Histological Cyclic Endometrial Changes in Dairy Cows: An Overview. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences* 2(1): 10–12. <https://juniperpublishers.com/jdvs/JDVS.MS.ID.555577.php>.
- Fitch CP, Bishop LM. 1932. A bacteriologic study of the gravid and non-gravid bovine uterus. *Cornell. Veterinarian*, 22: 225-238. Citado por Clark WA,

- Stevenson WG. 1949. The Bacterial Flora of the Normal Non-Gravid and Gravid Bovine Uterus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 13 (4).
- Fitzgerald KA, Palsson MEM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE. 2009. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 413:78–83.
- Franasiak JM, Werner MD, Juneau CR, Tao X, Landis J, Zhan Y, Treff NR, Scott RT. 2016. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: Next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33: 129-136. doi: 10.1007/s10815-015-0614-z
- Galina C. 2008. *Reproducción de Animales Domésticos*. 3ra ed. Valencia, pp. 508.
- Gärtner MA, Bondzio A, Braun N, Jung M, Einspanier R, Gabler C. 2015. Detection and characterisation of *Lactobacillus* spp. in the bovine uterus and their influence on bovine endometrial epithelial cells in vitro. *PLoS ONE*, 10(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119793>
- Griffin S, Healey D, Sheldon IM. 2018. Isoprenoids increase bovine endometrial stromal cell tolerance to the cholesterol-dependent cytolysin from *Trueperella pyogenes*. *Biology of Reproduction*, 99(4). 749–760. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy099>
- Hafez ES. 1996. *Reproducción e Inseminación Artificial*. 7th ed. Kiawah Island, South Carolina: Mc-Graw-Hill Interamericana.
- Haimerl P, Arlt S, Borchardt S, Heuwieser W. 2017. Antibiotic treatment of metritis in dairy cows. A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 100 (5), 3783–3795. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11834>.
- Henao Restrepo, G. (2001). Reactivación ovárica postparto en bovinos. Revisión. *Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 54, 1–19.

- Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, White JO, Cronin J, Sheldon IM. 2009. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7:55.
- Hopper MR. 2015. *Bovine Reproduction*. USA: Wiley Blackwell.
- Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. 2001. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. 4:705–714.
- Jacques M, Olson ME, Crichlow AM. 1986. The Normal Microflora of the Female Rabbit's Genital Tract. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50, pp. 272–274.
- Jeon SJ, Vieira A, Gobikrushanth M, Daetz R, Mingoti RD, Parize ACB, de Freitas AL, da Costa ANL, Bicalho RC, Lima S, Jeong KC, Galvão KN. 2015. Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 6324– 6332. doi: 10.1128/AEM.01753-15
- Kawasaki T, Kawai T. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Kim S, Covington A, Pamer, EG. 2017. The Intestinal Microbiota: Antibiotics, Colonization Resistance, and Enteric Pathogens. *Immunological reviews*, 279(1), 90–105. <https://doi.org/10.1111/imr.12563>.
- Knudsen LRV, Karstrup, CC, Pedersen, HG, Angen Ø, Agerholm, JS, Rasmussen E. L, Klitgaard, K. 2015. An investigation of the microbiota in uterine flush samples and endometrial biopsies from dairy cows during the first 7 weeks postpartum. *Theriogenology*, 86(2), 642–650. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.016>

- Ledezma, R., Garza, D., Moreno, G., Manzanares, N., Picón, F., Ramírez, R., & Sánchez, F. 2015. Efecto del CIDR posinseminación sobre la tasa de preñez en vacas de carne. *Ciencia UANL*, (73).
- Lee JY, Lee M, Sung KL. 2011. Role of Endometrial Immune Cells in Implantation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 38. 119–25.
- Levy M, Thaiss, CA, Zeevi D, Dohnalová L, Zilberman, G, Mahdi, JA, Harmelin A. 2017. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell*, 163(6): 1428–1443. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.048
- Madoz LV, Giulliodori MJ, Jaureguiberry M, Plöntzke J, Dirillich M, de la Sota RL. 2013. The Relationship between Endometrial Cytology during Estrous Cycle and Cutoff Points for the Diagnosis of Subclinical Endometritis in Grazing Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 96(7): 4333–39. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030213003573>.
- Malgor L, Valsecia ME. 2000. Capítulo 26. Farmacología de las hormonas sexuales femeninas. En: Malgor LA, Valsecia ME. *Farmacología Médica*. 2da ed. (p. 192-209).
- Moore SG, Ericsson AC, Poock SE, Melendez P, Lucy MC. 2017. Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4953–4960. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12592>
- Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, Alonso R, Alamá P, Remohí J, Pellicer A, Ramon D, Simon MD. 2016. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(6), 684–703. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.075>

- Mori M, Bogdan A, Balassa, T, Csabai T. 2016. The decidua — the maternal bed embracing the embryo — maintains the pregnancy. *Seminars in Immunopathology*, 635–649. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0574-0>
- O’Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. 2013. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS ONE*, 8(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080074>
- Peter S, Gärtner MA, Michel G, Ibrahim M, Klopffleisch R, Lübke-Becker A, ... Gabler C. 2018. Influence of intrauterine administration of lactobacillus buchneri on reproductive performance and pro-inflammatory endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22856-y>
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. 2005. Review article: Bifidobacteria as probiotic agents— Physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22:495–512.
- Rajilic SM, de Vos WM. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*. 38:996–1047
- Reid G. 2008. Probiotic lactobacilli for urogenital health in women. *Journal of Clinical Gastroenterology*, (Suppl. 3), 42. 234–236.
- Robin HN. Farmer BM. 2018. Genetic testing techniques. In: *Pediatric Cancer Genetics*, Gomes A. Korf B. (eds). Elsevier. 47-64
- Rodicio MR, Mendoza MC. 2004. Identificación Bacteriana Mediante Secuenciación del ARNr 16S : Fundamento, Metodología y Aplicaciones En *Microbiología Clínica. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4): 238–45.
- Rodríguez MR, Chavarría NIC, Meza HCA, Alvarado EAS, Morales CJL, González AV. H., ... García, OA. 2018. Eficiencia reproductiva de Ovsynch + CIDR

- en vacas Holstein bajo un esquema de inseminación artificial a tiempo fijo en el norte de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9, 12.
- Rzewuska, M., Kwiecierz, E., Chrobak, D. C., Stefńska, I., & Gierynska, M. (2019). Pathogenicity and Virulence of *Trueperella pyogenes*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms20112737>
- Sá Filho, MF, Ayres, H, Ferreira, RM, Marques, MO, Reis, EL, Silva, RC, Rodrigues, CA, Madureira, EH, Bó, GA and Baruselli, PS 2010a. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*, 73, 651–658.
- Santos TMA, Gilbert, RO, Bicalho RC. 2011. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(1), 291–302. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3668>
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8), 1516–1530. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>
- Sheldon IM, Owens SE. 2017. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. *Animal Reproduction*, 14(3), 622–629. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR1006>
- Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. 2010. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One*, 5: e9192. doi:10.1371/journal.pone.0009192.
- Sheldon IM. 1999. Endometritis: A review. *Journal of Animal Breeding*, 3, 2–19.

- Shin NR, Whon TW, Bae JW. 2015. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33:496–503.
- SigmaAldrich.com. (s.f). *Sanger DNA Sequencing Steps and Method*. Recuperado el 13 de octubre 2020. Recuperado en <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>
- Spencer T, Hansen T. 2015. Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammal. In R. Geisert & F. Bazer (Eds.), *Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals* (45th ed., p. 271). https://doi.org/10.1007/978-3-319-15856-3_7.
- Suarez A. 2017. Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia*, 1–7.
- Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Pavunc A, Habjanic K, Matosic S. 2010. Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 9862(3), 296–307.
- Tao X, Franasiak JM, Zhan Y, Scott RT, Rajchel J, Bedard J, Chu T. 2017. Characterizing the endometrial microbiome by analyzing the ultra-low bacteria from embryo transfer catheter tips in IVF cycles: Next generation sequencing (NGS) analysis of the 16S ribosomal gene. *Human Microbiome Journal*, 3, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2017.01.004>
- Thompson JF, Steinmann KE. 2010. Single Molecule Sequencing with a HeliScope Genetic Analysis System. *Current Protocols in Molecular Biology*, 7:10.
- Turner ML, Cronin JG, Healey GD, Sheldon IM. 2014 Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6. *Endocrinology*, 155:1453-65.
- Ubeda C, Djukovic A, Isaac S. 2017. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clinical & Translational Immunology*, 6:128.

- Universidad de Navarra. (2020). *Diccionario Médico*. Recuperado del 15 marzo de 2020. Recuperado de <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/microbiota>.
- Valenzuela GF, Casillas HR, Villalpando E. 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4): 297-313
- Vallejo TDA, Chaves VCA, Martínez AJM, Benavides CJ, Ojeda XE. 2014. Endometritis subclínica diagnosticada mediante cytobrush y comportamiento reproductivo en vacas del municipio de Pupiales, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (27), 111. <https://doi.org/10.19052/mv.3028>
- Wang ML, Liu MC, Xu J, An LG, Wang JF, Zhu YH. 2018. Uterine microbiota of dairy cows with clinical and subclinical endometritis. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02691>
- Wang S, Wang Q, Yang E, Yan L, Li T, Zhuang H. 2018. Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal *Lactobacillus Crispatus* Are Able to Strongly Inhibit *Candida Albicans* Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-Related Gene Expressions. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1–11.
- Wang YKM, Telesford J, Ochoa RS, Haque BM, Christy EJ, Kasper L, Wang Y, Wu SC, Robson DL, Kasper LH. 2014 An intestinal commensal symbiosis factor controls neuroinflammation via TLR2-mediated CD39 signalling. *Nature Communications* 5. 4432, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5432>.
- Williams WL. 1943. *The Diseases of the Genital Organs of Domestic Animals*. Published by the author, Ithaca, N.Y., pp. 296-297.
- Witkin SS, Linhares IM. 2017. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynecology*, 124(4), 606–611. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.14390>
- Youngquist RS, Threlfall WR. 2007. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. USA: Saunders.

Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Frenette PS. 2015. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*, 525(7570), 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature15367>